

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430135

研究課題名(和文)スフィンゴ脂質類の新規腫瘍マーカーとしての臨床検討

研究課題名(英文)Research of sphingolipids as a novel tumor marker for clinical study

研究代表者

富岡 佳久(TOMIOKA, YOSHIHISA)

東北大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00282062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：質量分析法を用いた高感度スフィンゴ脂質定量系によって、健常者と各がん患者の血中スフィンゴ脂質を定量分析し、特にスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)の新規腫瘍マーカーとしての臨床応用性を検討した。平均血漿S1P濃度は健常者 $410 \pm 67$  nM、食道がん患者 $620 \pm 129$  nM、胃がん患者 $484 \pm 151$  nM、肉腫患者 $491 \pm 106$  nMであった。食道がん患者血漿中S1P濃度が健常者と比較して有意に高値であることをはじめて明らかにした。さらにメタボローム解析/統計解析を用いるプロファイリングにより、がん病態解析の新規バイオマーカー候補として、特にシステインの可能性を見いだした。

研究成果の概要(英文)：Using the quantitative method of high sensitivity mass spectrometry for sphingolipid, healthy subjects and blood sphingolipid of each cancer patient was analyzed quantitatively. Especially, it was investigated clinical applicability as a novel tumor marker of S1P. Plasma S1P concentrations were  $410 \pm 67$  nM,  $620 \pm 129$  nM,  $484 \pm 151$  nM, and  $491 \pm 106$  nM in healthy, esophageal cancer, stomach cancer, sarcoma, respectively. Esophageal cancer patient plasma S1P concentration was for the first time revealed that it is significantly higher compared to the healthy subjects. Using metabolome analysis profiling for cancer disease analysis as some new biomarker candidates, in particular, I found the possibility of cystine.

研究分野：腫瘍薬学

キーワード：腫瘍マーカー 脂質メディエーター メタボローム解析 アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ脂質は、哺乳動物細胞の細胞膜を構成する成分の一つであるが、近年、生理活性を有する脂質分子としても注目されている。この中で、スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は細胞内におけるセカンドメッセンジャーとしての役割に注目されていたが、対応するトランスポーター (Spns2) や受容体 (S1PRs) が発見・同定されたことにより、細胞外生理活性脂質分子としての役割解明が行われ、細胞の分化、増殖、遊走、血管新生、がん細胞浸潤能の獲得、化学療法薬への耐性等に関与していると考えられている。また、動物実験の結果から、腫瘍組織においてはスフィンゴシン (Sph) のリン酸化酵素である SphK の発現が増加していること、ヒト大腸がん組織において S1P 脱リン酸化酵素 (SPP) や S1P 分解酵素 (SPL) の発現が減少していること、S1P の上昇が腫瘍の進展に寄与していることが明らかにされてきた。ヒトがん患者の S1P に関しては、ヒト卵巣がん患者の血漿中の S1P 濃度が高値であったとされる一方で、乳がん患者においては有意差が認められないとする報告もあり、がん患者の血中における S1P をはじめとするスフィンゴ脂質類の動向に統一的な検討結果が得られていない状況である。現在、がんの日常診療で汎用される腫瘍マーカーとして、CEA、CA19-9、SCC など数多くが挙げられる。これらは、がんの再発や治療抵抗性を把握するうえで重要であるが、全てのがん患者の病勢を正確に反映するものではない。また骨軟肉腫などの非上皮性腫瘍においては、いまだ有望な腫瘍マーカーが存在していないのが現状である。従って、がんの診断や病勢を把握するための新たな腫瘍マーカーの発掘・開発は極めて有用であり、特に今回着目するスフィンゴ脂質類とがん発生、進行、転移などとの相関性を“臨床試料”を用いて検証し、明らかにしていくことは、がん治療をさらに発展させるために重要かつ社会への還元が大いに期待できる研究と考えた。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、既に構築してある質量分析法を用いた高感度スフィンゴ脂質定量系によって、健常者及び各がん腫患者の血中スフィンゴ脂質類を定量分析し、特にスフィンゴ-1-リン酸 (S1P) が新規腫瘍マーカーとしての臨床応用性を検討することによって、がんの診断や病勢把握への臨床適用性を評価することにある。

3. 研究の方法

(1) 高精密度質量分析装置を活用するがん患者血漿中スフィンゴ脂質類の病勢解析および腫瘍マーカーとしての臨床評価

各がん腫患者の血漿試料におけるスフィンゴ脂質類を測定し、定量解析を行うことによりがんの関連性、病勢との関連性を検討する。

メタボローム解析 / 統計解析を用いるプロファイリングにより新規バイオマーカーの探索を行い、新たな研究シーズの発掘につなげる。

4. 研究成果

(1) 血清中スフィンゴ脂質類濃度の検討

健常者 10 例および食道がん患者 11 例の血清中スフィンゴ脂質類 (S1P 及び dhS1P) の濃度を測定した (表 1)。一方、検出できたものの Sph 及び dhSph は定量下限以下であった。pS1P 及び pSph は前例で検出されなかった。ヒト血清中 S1P 濃度は数百 nM ~ 1 μM 程度であると報告とほぼ一致した。

表 1. スフィンゴ脂質類の血清中濃度

	健常者 (n=10)	食道がん患者 (n=11)
S1P	708 ± 210 nM (中央値 633 nM)	1,470 ± 366 nM (中央値 1,420 nM)
dhS1P	179 ± 68.0 nM (中央値 174 nM)	84.6 ± 15.1 nM (中央値 85.3 nM)
S1P/dhS1P	8.52	9.03

(2) 血漿中 S1P の測定

S1P は、赤血球や血小板から放出されること及び(1)の結果を考慮し、採血から測定までの試料の取扱を厳密に管理した。すなわち採血後迅速に氷冷・遠心後に得られた血漿を試料とした。インフォームドコンセントを得た健常者 10 例、食道がん患者 6 例、胃がん患者 5 例、肉腫患者 3 例の計 24 試料を測定対象とした。その結果、今回の測定における平均血漿中 S1P 濃度は、健常者 410 ± 67 nM、食道がん患者 620 ± 129 nM、胃がん患者 484 ± 151 nM、肉腫患者 491 ± 106 nM であった。食道がん患者血漿中 S1P 濃度が健常者と比較して有意に高値であることをはじめて明らかにした。また、他のがん腫では有意ではないものの、健常者より血漿中 S1P 濃度が高い傾向が認められた。

(3) 非標的血漿メタボローム解析法の構築

がん患者血漿成分中の疾病マーカーの探索を目的として C18 カラムを用いた LC/HRMS による非標的血漿メタボローム解析手法の構築を行った (図 1)。その結果、測定の成否を評価するために、試料測定前に 10 回、試料注入 5 回毎に 1 回 QC 試料の測定を実施する測定手順を構築した。試料を LC/HRMS で測定して得られたデータを SIEVE で処理した後、HMDB と照合した。フレーミング処理後の解析結果をエクセルファイルに変換し、保持時間と m/z を紐付けし、検出イオンリストを生成した。

健常者血漿試料 8 例とがん患者血漿試料 11 例について、本研究によって構築した非標的血漿メタボローム解析を行ったところ、がん患者血漿中のリゾホスファチジルコリン (LPC18:2) が健常者血漿に比較して低値を LC-MS/MS を用いた LPC18:2 の精密測定法を構

築し、改めてがん患者血漿と健常者血漿中の LPC18:2 濃度を評価したところ、がん患者血漿中 LPC18:2 は健常者に比較して有意に低値を示した。

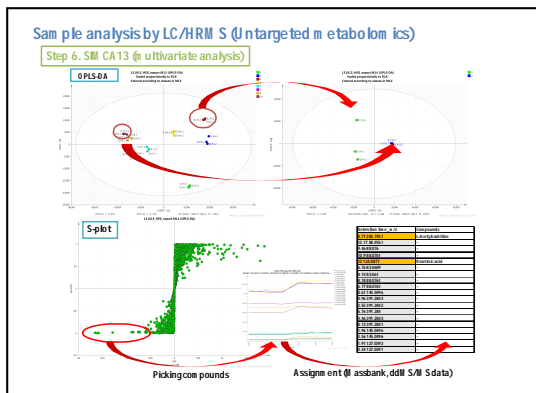


図 1 . 非標的メタボローム解析の流れ

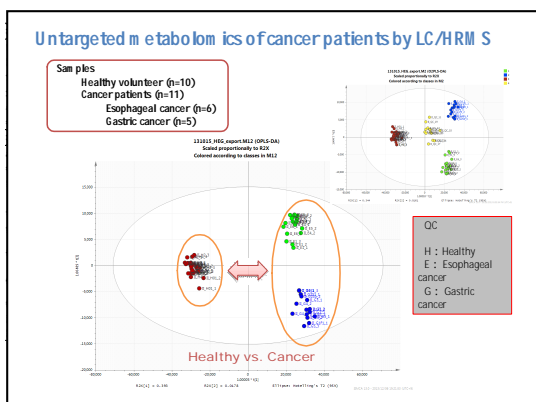


図 2 . 健常者とがん患者の OPLS-DA 解析

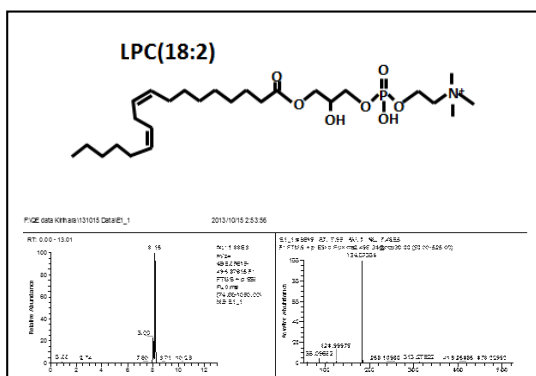


図 3 . LysoPC18:2 の同定

LC/HRMS による非標的的血漿メタボローム解析用分析カラムを汎用 ODS カラムから SS-C18 カラムに変更し、血漿 50  $\mu\text{L}$  に 0.1%ギ酸/アセトニトリル溶液 200  $\mu\text{L}$  と IS として 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の  $^{15}\text{N}_4$  ヒポキサンチン溶液 10  $\mu\text{L}$  を加え、5 分間のソニケーション処理を行った。その後、遠心処理 (16,400g、4、10 分間) した上清画分 200  $\mu\text{L}$  を新たなチューブに移し窒素乾固 (60 ) した。その後、0.1%ギ酸/水溶液 100  $\mu\text{L}$  により再溶解し、測定用試料とした。また、全試料から等量混合したものを QC 試

料とした。LC/HRMS による測定条件は、表 2 に示した。

表 2 . LC/HRMS による測定条件

M/S device	Q Exactive (Thermo Fisher Scientific)
Ionization	HESI (+) and (-)
Experiment Type	Full MS (scan range $m/z$ 70-800.0)
Source Voltage	(+): 3500 V, (-): 2500V
Sheath Gas Press	50 psi
Auxiliary Gas Press	15 psi
Capillary Temp	275 $^{\circ}\text{C}$
LC device	NANOSPACE SH-2 (SHISEIDO)
Analytical column	SS-C18(2.0 x 50 mm, 3.0 $\mu\text{m}$ , Intact)
Guard column	SS-C18 C18(4 x 5 mm, Intact)
Mobile phase	(A) 0.1% formic acid in $\text{H}_2\text{O}$ (B) 100mM ammonium formate/ACN=30:70
Wash liquid	$\text{H}_2\text{O}$
Wash Liquid Port	50% ACN/ $\text{H}_2\text{O}$
Flow rate	200 $\mu\text{L}/\text{min}$ (0-10.0min, 16.0-18.0 min) 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ (10.0-16.0 min)
Gradient	1% B (0-1.2 min), 1-15% B (1.2-1.5 min), 15-55% B (1.5-2.5 min), 55-99% B (2.5-8.5 min), 99% B (8.5-12 min), 99-1% B (12-13min), 1%(13-18)
Oven temp	40 $^{\circ}\text{C}$
Injection volume	1 $\mu\text{L}$
Divert valve	detector (0-10 min), waste (10-13 min), detector (13-18 min)

スコアプロットから QC 試料は概ね集まり、安定した測定であったと判断できた (図 4)。

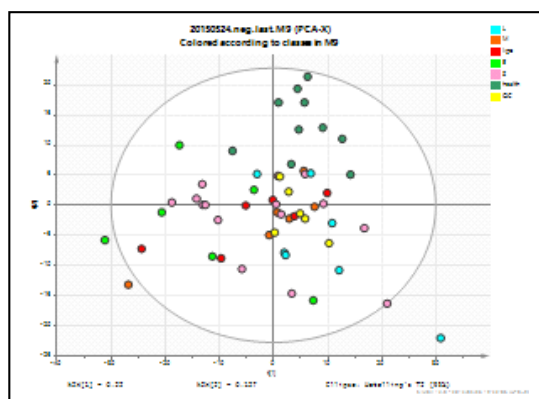


図 4 . 代表的スコアプロット (ネガティブイオンモード、QC : 黄色丸印で表示)

次いで、健常者とがん患者の両群の測定結果を判別分析に付した。代表的な判別分析の結果を図 5 に示した。

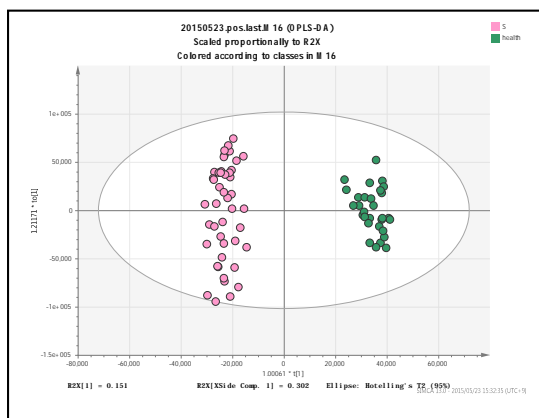


図 5 . 代表的な判別分析 (健常人 (桃色) と胃がん患者 (緑色)、ポジティブイオンモード)

QC 試料における変動係数が 30%未満、有意水準 0.05 未満、がん患者と健常者のピーク強度比が 2 倍以上または 0.5 倍以下、試料における変動係数が 30%未満、クロマトグラムでもピークとして確認でき、ブランク試料でもほとんど検出されないものを選択した。

表3. 各がん腫（非上皮系）における新規バイオマーカー候補の探索結果

ID	m/z	RT	強度比	P 値	ppm
悪性線維性組織球腫、ポジティブイオンモード					
479	148.060	2.50	2.07	1.31E-11	0.7
490	149.064	2.52	2.47	1.41E-10	5.5
152	116.017	2.41	0.46	1.60E-01	
562	155.035	1.77	0.47	1.89E-01	5.0
883	182.102	0.78	0.44	2.70E-01	8.0
934	187.058	0.81	0.39	2.36E-01	
悪性線維性組織球腫、ネガティブイオンモード					
267	146.045	2.50	2.12	2.16E-11	9.6
283	147.049	2.51	2.31	1.81E-11	1.3
673	195.051	1.24	2.02	2.64E-08	3.9
1113	239.017	4.61	17.1	1.71E-14	0.6
1177	245.971	2.51	2.29	1.09E-07	-
315	153.019	1.78	0.48	3.69E-21	2.4
319	154.023	1.79	0.46	3.77E-19	-
388	209.066	0.79	0.38	6.08E-12	8.9
脂肪肉腫、ポジティブイオンモード					
33	120.066	1.19	2.04	1.06E-08	5.7
484	147.113	5.28	2.63	8.27E-09	1.5
479	148.060	2.50	2.44	1.22E-16	0.7
775	175.119	5.66	2.13	2.35E-07	0.4
958	189.135	5.80	2.06	1.74E-09	0.2
1095	203.150	5.35	2.16	6.41E-10	0.6
1189	210.081	0.84	97.1	2.43E-11	-
1389	231.065	5.38	2.32	1.30E-11	1.1
2422	425.937	5.04	3.36	2.02E-09	-
45	91.095	4.59	0.50	2.00E-12	
152	116.017	2.41	0.45	2.73E-16	
562	155.035	1.77	0.43	4.27E-17	5.0
638	162.112	3.53	0.48	2.71E-05	1.0
883	182.102	0.78	0.44	7.83E-10	8.0
934	187.058	0.81	0.44	4.01E-10	-
脂肪肉腫、ネガティブイオンモード					
267	146.045	2.50	2.49	2.54E-15	9.6
463	171.041	1.21	5.49	4.98E-10	5.8
603	187.120	5.83	2.02	9.83E-10	4.1
673	195.051	1.24	2.28	1.10E-13	3.9
1113	239.017	4.61	18.3	5.76E-15	0.6
1116	239.093	5.96	3.37	1.14E-12	1.5
315	153.019	1.78	0.45	2.04E-23	2.4
平滑筋肉腫、ポジティブイオンモード					
156	133.097	5.30	2.78	1.06E-12	3.2
327	155.079	5.23	2.25	9.44E-10	-
329	133.097	5.25	2.88	1.13E-12	1.2
479	148.060	2.50	3.27	3.32E-13	0.7
717	170.043	2.51	3.09	1.56E-10	-
1095	203.150	5.35	2.29	4.64E-13	0.6
1757	276.119	2.99	3.42	9.93E-12	0.4
152	116.017	2.41	0.48	2.27E-15	-
562	155.035	1.77	0.47	2.84E-16	5.0
883	182.102	0.78	0.41	1.87E-10	8.0
934	187.058	0.81	0.34	5.82E-12	-
1295	221.165	5.46	0.47	1.92E-15	-
平滑筋肉腫、ネガティブイオンモード					
287	146.045	2.50	2.31	2.19E-13	9.6
673	195.051	1.24	2.54	5.39E-14	3.9
728	201.136	5.40	2.00	1.24E-07	2.9
1113	239.017	4.61	22.0	3.69E-15	0.6

新規バイオマーカーの探索を行った（表3、表4）。特に健常者とがん患者で差違が大きい2成分（負イオンモード：がん患者で高値 m/z 239.0169（図6）、がん患者で低値 m/z 153.0190）を見いだした。成分 m/z 239.0169

をシスチンと同定した。また、シスチン以外のアミノ酸類血漿中量の変動が明らかになった。このことは、アミノ酸プロファイル解析ががん病態の解析に有用である可能性を示唆した。続いて、担がんマウスと対照マウスから得た血漿を用いて非標的血漿メタボローム解析を行ったところ、がんで高値となる4成分を見だし、それぞれ1-メチルイノシン、N-アセチルシチジン、ダンボニトール、N-5-(N,N-ジメチルカルバミミドイル-オルニチン)である可能性が示された。

表4. 各がん腫（上皮系）における新規バイオマーカー候補の探索結果

ID	m/z	RT	強度比	P 値	ppm
胃がん、ポジティブイオンモード					
1750	275.066	5.24	2.13	6.98E-17	-
1757	276.119	2.99	3.46	1.96E-22	0.4
562	155.035	1.77	0.45	2.14E-16	5.0
胃がん、ネガティブイオンモード					
673	195.051	1.24	2.84	1.13E-16	3.9
728	201.136	5.40	2.25	2.73E-17	2.9
1113	239.017	4.61	20.8	1.84E-26	0.6
1386	274.105	2.99	2.65	4.03E-19	1.0
2114	513.951	4.85	2.48	1.36E-12	-
2161	589.930	4.80	2.47	1.88E-12	-
315	153.019	1.78	0.48	1.77E-12	2.4
319	154.023	1.79	0.43	1.27E-23	-
食道がん、ポジティブイオンモード					
156	133.097	5.30	3.35	6.68E-07	3.2
199	122.027	2.27	2.40	8.72E-07	2.0
327	155.079	5.23	2.31	3.23E-06	1.7
464	147.113	5.28	2.01	1.69E-06	1.5
1113	204.154	5.31	2.07	8.03E-06	-
45	91.095	4.59	0.28	1.10E-18	-
152	116.017	2.41	0.40	1.50E-17	-
食道がん、ネガティブイオンモード					
114	120.011	2.27	2.27	7.52E-07	9.7
1113	239.017	4.61	16.39	7.82E-11	0.6
315	153.019	1.78	0.45	8.51E-23	2.4
319	154.023	1.79	0.43	4.20E-20	-

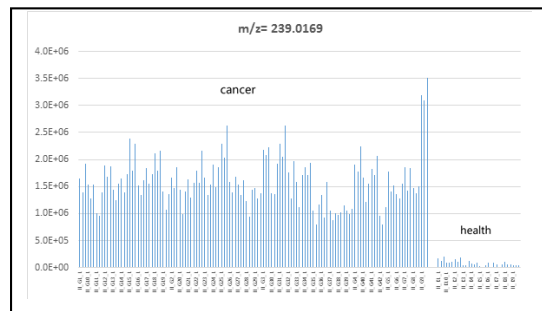


図6. がん患者血漿中で高値の m/z 239.0169

(4) セラミド等脂質メディエータの評価

セラミド等他の脂質類を評価するために、LCカラムをC18系からC8系に変更し、分析条件等を検討した。C18系の測定条件を元に一部変更した測定条件によってC8系カラムを用いて測定したQCデータをPCA解析した結果、測定の再現性が不十分であることが明らかになった。判別分析から、測定を重ねるに従って分析カラム等にPC、SM、PE等のリン脂質類が蓄積し、結果に影響することが判

明したため、洗浄過程等の改善を継続して検討する必要性が明らかになった。

そこでイソプロパノールを移動相に適用し、A相(水とアセトニトリルの混合液)とB相(アセトニトリルとイソプロパノールの混合液)の割合と時間をグラジエントモードにより検討した。全体的にピークの保持遺憾が早まるとともにピーク形状の改善も見られ、SphからTGまで検出可能となった。今後は、洗浄過程を再検討し、より安定した血漿中脂質メタボーム解析系の確立を目指す。

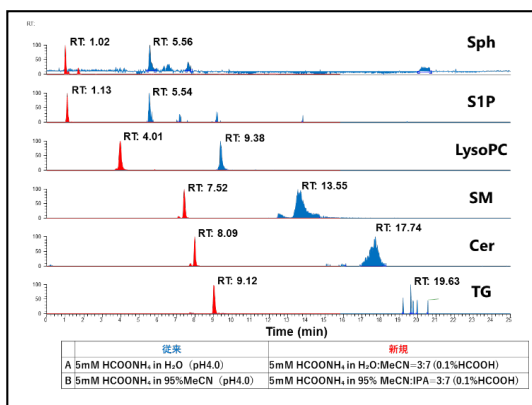


図7. 代表的な脂質類の分離状況

#### (5) 培養細胞を用いた細胞外 S1P 産生能評価系の構築とその評価

インビトロでの細胞外 S1P 産生能評価系を構築するにあたり、FBS、活性炭あるいは透析処置した FBS 中の S1P 濃度を評価したところ、いずれも 30 nM 程度の S1P が含まれていた。そこで無血清培地である CD CHO 培地に既知量のスフィンゴシンを添加した培地を用いる細胞外 S1P 産生能評価系を構築し、各種ヒトがん細胞における細胞外 S1P 産生能を評価したところ、TE-8 > PK-45H > HK-2 > AGS-65 > MCF-7 となり、細胞種による違いが明らかになった。さらに関与する mRNA 発現量を RT-PCR 法により評価し、違いに寄与する分子の同定を試みている。2015 年、培養細胞を用いた Matula らは、抗がん剤耐性と SPHK1 mRNA 発現量が正に相関し、SGPL1 と負に相関することを示した。これは、血漿中 S1P が化学療法に対する新規臨床治療効果予測マーカーとしての可能性を示す。しかし、さらなる詳細な研究が必要であると考えられた。

#### (6) 結論

高精密質量分析装置を活用し、がん患者血漿中スフィンゴ脂質類の病勢解析マーカーとして、スフィンゴシン-1-リン酸の有用性を示した。しかしながら臨床現場で用いるためには、実施者により負担のない試料採取法の確立も必要であることが明らかになった。

メタボローム解析/統計解析を用いるプロファイリングにより、がん患者の病態解析

に有用である可能性のある多くの新規バイオマーカー候補の発見がされた。特にアミノ酸誘導体であるシスチンの有用性を示した。今後の更なる検討により、その有用性が確固たるものになることが期待できる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

(1) Yukihiko Noda, Ikuko Yano, Takao Aoyama, Michiru Watanabe, Ainari Konda, Hitoshi Nakamura, Ryo Matsushita, Kunihiko Morita, Katsushi Miyake, Hakaru Seo, Naoki Kamimura, Yoshihisa Tomioka, Junko Kizu, Mayumi Mochizuki, The second survey on the actual conditions of pharmacist faculties in pharmacy schools in Japan.

J. Pharm. Health Care and Sci., 査読有, 2015, 41(4), 223-235. (in Japanese)

(2) Ichiro Kawahata, Shiori Ohtaku, Yoshihisa Tomioka, Hiroshi Ichinose, Tohru Yamakuni, Dopamine or biopterin deficiency potentiates phosphorylation at 40Ser and ubiquitination of tyrosine hydroxylase to be degraded by the ubiquitin proteasome system. Biochem Biophys Res Commun., 査読有, 465(1): 53-8, 2015.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.07.125.

(3) Michiyo Okudaira, Asuka Inoue, Akira Shuto, Keita Nakanaga, Kuniyuki Kano, Kumiko Makide, Daisuke Saigusa, Yoshihisa Tomioka, Junken Aoki, Separation and quantification of 2-acyl-1-lysophospholipids and 1-acyl-2-lysophospholipids in biological samples by LC-MS/MS., J. Lipid Res., 査読有, 55(10): 2178-92, 2014.

DOI: 10.1194/jlr.D048439

(4) Makoto Tsuji, Hironori Matsunaga, Daisuke Jinno, Hiroki Tsukamoto, Naoto Suzuki, Yoshihisa Tomioka

A validated quantitative liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry method for monitoring isotopologues to evaluate global modified cytosine ratios in genomic DNA., J. Chromatogr. B, 査読有, 953-954: 38-47, 2014. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.01.050

〔学会発表〕(計 7 件)

(1) 波多野 力、富岡佳久、三田智文、平澤典保、佐藤 博、新井洋由、草間真紀子、山元武人、武内靖雄、上原 孝、名倉弘哲 長期化課題研究及びアドバンスト教育プログラムを中心とした取り組みとその成果、日本薬学会第 136 年会、3月26日-29日、横浜

(2)草間真紀子、新井洋由、三田智文、波多野力、竹内靖雄、上原孝、名倉弘哲、富岡佳久

長期課題研究・アドバンスト教育プログラム及び最先端創薬研究プログラム、日本薬学会第135年会、3/25-28、神戸

(3)富岡佳久、薬剤師の育成と供給体制について、第3回宮城県地域医療学会、11/30、仙台

(4)Makoto Tsuji, Hironori Matsunaga, Daisuke Jinno, Hiroki Tsukamoto, Naoto Suzuki, Yoshihisa Tomioka, MPS31-10/A validated quantitative LC-MS/MS method using isotopic MRM transitions to evaluate global ratios of modified cytosines  
20th International Mass Spectrometry Conference (IMSC 2014), August 24-29, 2014, Geneva, Switzerland

(5)富岡佳久、薬剤師の職能将来像と社会貢献、日本学術会議・日本薬学会主催シンポジウム、8/25、東京

(6)富岡佳久、がん化学療法の新展開へ向けての課題、教育者の立場から、「がんプロフェッショナル養成基盤推進プラン高度がん医療開発を先導する専門家の養成」主催シンポジウム、7/6、東京

(7)富岡佳久、医師と連携する臨床ニーズに基づいた卒業研究、医療薬学フォーラム2014、6/28-29、東京

〔図書〕(計 1 件)

Tomohiro Takahashi, Daisuke Saigusa, Chihiro Takeda, Kohei Saito, Naoto Suzuki, Hiroki Tsukamoto, Yoshihisa Tomioka, Determination of Sphingolipids by LC-MS/MS, pp357-370, Bioactive Lipid Mediators: Current Reviews and Protocols, Takehiro Yokomizo and Makoto Murakami ed., Springer Japan K.K, 2015.  
DOI 10.1007/978-4-431-55669-5

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

富岡 佳久(TOMIOKA YOSHIHISA)  
東北大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：00282062